

- 409-414.
- [ 2 ] Leung P S, CHU K H, Chow W K, et al. Cloning, expression, and primary structure of *Metapenaeus ensis* tropomyosin, the major heat-stable shrimp allergen [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1994, 94 (5) :882-890.
- [ 3 ] Reese G, Ayuso R, Lehrer S B. Tropomyosin: an invertebrate pan-allergen [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 1999, 119(4) :247-258.
- [ 4 ] García-Orozco K D, Aispuro-Hernández E, Yepiz-Plascencia G, et al. Molecular characterization of arginine kinase, an allergen from the shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2007, 144(1) :23-28.
- [ 5 ] Shiomi K, Sato Y, Hamamoto S, et al. Sarcoplasmic calcium-binding protein: identification as a new allergen of the black tiger shrimp *Panaeus monodon* [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2008, 146(2) :91-98.
- [ 6 ] Ayuso R, Grishina G, Ibáñez M D, et al. Sarcoplasmic calcium-binding protein is an EF-hand-type protein identified as a new shrimp allergen [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 124 (1) :114-120.
- [ 7 ] Ayuso R, Grishina G, Bardina L, et al. Myosin light chain is a novel shrimp allergen, Lit v 3 [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, 122(4) :795-802.
- [ 8 ] 李婵, 李韶深, 任杰, 等. 天津地区梭子蟹中过敏原组分分析 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2012, 24(5) :421-424.
- [ 9 ] Lehrer S B, Ayuso R, Reese G. Seafood allergy and allergens: a review [J]. *Marine Biotechnology*, 2003, 5(4) :339-348.
- [ 10 ] CHU K H, WONG S H, Leung P S. Tropomyosin is the major mollusk allergen; reverse transcriptase polymerase chain reaction, expression and IgE reactivity [J]. *Mar Biotechnol*, 2000, 2(5) :499-509.
- [ 11 ] YU C J, LIN Y F, CHIANG B L, et al. Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m 2 [J]. *J Immunol*, 2003, 170(1) :445-453.

## 研究报告

# 2006—2011年西安市食品及食物中毒中金黄色葡萄球菌毒素基因分布及分型研究

彭雁, 吴守芝, 栾阳, 王增国, 李芳, 刘晓岑

(西安市疾病预防控制中心, 陕西 西安 710054)

**摘要:**目的 了解 2006—2011 年西安市污染食品及食物中毒中金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 分离株肠毒素 (SEs)、杀白细胞素 (PVL)、表皮剥落毒素 (ETs)、毒性休克综合征毒素-1 (TSST-1) 等毒素基因的分布状况, 并比较两种分离株在基因分布及分型上的差异。方法 采用多重 PCR 法检测 61 株 *S. aureus* (包括 40 株食品分离株和 21 株食物中毒分离株) *sea*、*seb*、*sec*、*sed*、*pvl*、*eta*、*etb*、*tsst-1* 基因, 其中 *sea*、*seb*、*sec*、*sed* 基因引物加入同一反应体系, 剩余 4 对基因引物加入另一反应体系。结果 40 株食品分离株中 17 株检出毒素基因 (42.50%); 21 株食物中毒分离株中 18 株检出毒素基因 (85.71%), 食物中毒分离株毒素基因的检出率明显高于食品分离株 ( $P < 0.01$ )。食品分离株中主要流行的毒素基因为 *sea* (25%)、*eta* (12.5%), 未检测到携带 *etb*、*tsst-1* 基因的菌株; 同时得到 8 种毒素基因型, 主要流行的基因型为 *sea* (10.00%)、*sea + eta* (7.50%)。食物中毒分离株中主要流行的毒素基因为 *sea* (76.19%)、*sec* (28.57%), 未检测到携带 *pvl* 基因的菌株; 同时得到 6 种毒素基因型, 主要流行的基因型为 *sea* (42.86%)、*sea + sec + tsst-1* (14.29%)。结论 *S. aureus* 食品分离株和食物中毒分离株在毒素基因的分布及分型上存在较大差异。

**关键词:**金黄色葡萄球菌; 毒力基因; 多重 PCR; 基因分型; 食物中毒

中图分类号: R155.31; R378; TS201.3 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2013)05-0413-04

## Distribution of toxin genes and genotyping in *Staphylococcus aureus* isolated from food and food poisoning from 2006 to 2011

PENG Yan, WU Shou-zhi, LUAN Yang, WANG Zeng-guo, LI Fang, LIU Xiao-cen  
(Xi'an Center for Disease Control and Prevention, Shaanxi Xi'an 710054, China)

**Abstract: Objective** To obtain an overview of epidemic characteristics of Staphylococcal enterotoxins (SEs), Pantone-Valentine leukocidin (PVL), exfoliative toxins (ETs), and toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) genes of

收稿日期: 2013-05-28

作者简介: 彭雁 女 主管检验技师 研究方向为微生物检验 E-mail: xapengyan@163.com

通讯作者: 吴守芝 女 主任检验技师 研究方向为微生物检验 E-mail: shouzhwu6538@163.com

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) isolated from food and food poisoning samples in Xi'an from 2006 to 2011, and to compare the difference of gene distribution and genotyping between the two kinds of isolates. **Methods** The genes of *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *eta*, *etb*, *tsst-1* and *pvl* were detected by multiplex PCR. The multiplex PCR assay combined the primers of *sea*, *seb*, *sec* and *sed* in one reaction and the other four primers in another. **Results** Out of 40 *S. aureus* strains isolated from food, 17 strains were detected toxin genes (42.50%). In 21 strains isolated from food poisoning, 18 strains were detected toxin genes (85.71%). The detection rate of toxin genes in food poisoning isolates was much higher than that in food isolates ( $P < 0.01$ ). *Sea* (25%) and *eta* (12.5%) were the most common genes and *sea* (10.00%) and *sea + eta* (7.50%) were the main toxin genotypes in food isolates, and *etb*, *tsst-1* genes were not detected. *Sea* (76.19%) and *sec* (28.57%) were the most common genes and *sea* (42.86%) and *sea + sec + tsst-1* (14.29%) were the main toxin genomic types in food poisoning isolates, and PVL gene were not detected. **Conclusion** There were significant differences in toxin gene distribution and genotyping between *S. aureus* isolates from food and isolates from food poisoning.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*; toxin genes; multiplex PCR; genotyping; food poisoning

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) 是引起食品污染最常见的细菌之一, 其致病性与它产生的多种外毒素有关, 主要有肠毒素 (staphylococcal enterotoxin, SEs)、杀白细胞素 (panton-valentine leukocidin, PVL)、表皮剥落毒素 (exfoliative toxin, ETs)、毒性休克综合征毒素-1 (toxic shocks yndrometoxin-1, TSST-1) 等。SEs 是引起食物中毒的主要因子, 目前鉴定出的肠毒素有 SEA ~ SEO 等血清型, 其中以 SEA ~ SED 型较常见。PVL、ETS、TSST-1 与临床关系较为密切, PVL 通过作用于中性粒细胞和巨噬细胞的细胞膜, 造成大量白细胞的死亡, 在 *S. aureus* 所致的坏死性皮肤损害和坏死性肺炎等疾病中起了重要作用<sup>[1]</sup>。ETs 主要由噬菌体 II 群 *S. aureus* 产生, 已知的血清型 ETA、ETB 与人葡萄球菌性烫伤样皮肤综合症 (SSSS) 密切相关, 患者皮肤呈弥漫性红斑和水疱, 继而表皮上层大片脱落<sup>[2]</sup>。TSST-1 是由噬菌体 I 群 *S. aureus* 产生的一类蛋白质, 同肠毒素 A、B、C、D、E 一起都具有超抗原活性, 可引起机体发热、休克及脱屑性皮炎, 感染产毒菌株后可引起多个器官系统的功能紊乱或毒性休克综合症<sup>[2]</sup>。

以往有关 *S. aureus* 食品及食物中毒分离株的研究多集中在肠毒素基因的检测分析上, 而对 *pvl*、*eta*、*etb*、*tsst-1* 基因的研究较少, 本文采用多重 PCR 法检测了西安市 *S. aureus* 食品及食物中毒分离株 *sea* ~ *sed*、*pvl*、*tsst-1*、*eta* ~ *etb* 等毒素基因, 并比较了两种分离株在基因分布及分型上的差异。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 菌株来源与鉴定

2006—2011年西安市食品污染物监测样品及食物中毒样品中分离的61株*S. aureus*, 均由西安市疾病预防控制中心微生物检验科提供。按照标准

的实验室操作规范, 采用常规方法及 VITEK-2 全自动微生物鉴定仪对其进行鉴定均为金黄色葡萄球菌。*S. aureus* 标准菌株为 ATCC 29213。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

VITEK-2 全自动微生物鉴定仪、PCR 仪、凝胶成像仪、电泳仪、50 bp Marker (美国 Promega 公司), PCR 试剂 [宝生物工程 (大连) 有限公司]。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 引物设计与合成

根据 GenBank 中发布的基因序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计 *sec* 及 *pvl* 基因扩增引物, *sea*、*seb*、*sed*、*tsst-1*、*eta*、*etb* 基因引物设计参考文献 [3], 引物均由美国 Life Technologies 公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 多重 PCR 所用引物

Table 1 Primers used in the multiplex PCR

目的基因	引物	引物序列 (5'-3')	扩增产物/bp
<i>sea</i>	<i>sea-1</i>	CCTTTG GAA ACG GTTAAA ACG	127
	<i>sea-2</i>	TCTGAA CCTTCC CATCAA AAA C	
<i>seb</i>	<i>seb-1</i>	TGC CATCAA ACTGAC AAA CG	477
	<i>seb-2</i>	GCA GGTACTCTA TAA GTG CTTGC	
<i>sec</i>	<i>sec-1</i>	AAGAAAAGTGTAAACAGCTCAAGAAC	224
	<i>sec-2</i>	GAATCAACCGTTTTATTGTCTGT	
<i>sed</i>	<i>sed-1</i>	CTA GTTTGG TAA TATCTC CTTTAA ACG	319
	<i>sed-2</i>	TTA ATG CTA TATCTTATAGGG TAAACA TC	
<i>pvl</i>	<i>pvl-1</i>	AGTACACAGTGGTTTCAATCCCTTC	352
	<i>pvl-2</i>	CACTTACAGGTGTGATATGTTGAGC	
<i>eta</i>	<i>eta-1</i>	CTA GTG CATTGG TTA TTC AAG ACG	119
	<i>eta-2</i>	TGC ATTGAC ACC ATA GTA CTTATTC	
<i>etb</i>	<i>etb-1</i>	ACG GCTATA TAC ATTCAA TTC AATG	262
	<i>etb-2</i>	AAA GTTATTCATTTA ATG CAC TGTCTC	
<i>tsst-1</i>	<i>tsst-1</i>	AAG CCC TTTGTGCTTGC G	445
	<i>tsst-2</i>	ATC GAA CTTTGG CCC ATA CTTT	

#### 1.2.2 多重 PCR 法检测金黄色葡萄球菌毒素基因

##### 1.2.2.1 DNA 模板的提取

将冰冻保存的 *S. aureus* 菌株转种血平板, 36 °C 培养 24 h, 用接种环挑取 5 ~ 7 个菌落入 300 μl 生理盐水, 混匀后 10 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 沉

淀重悬于 300  $\mu\text{l}$  的裂解液 (1% TritonX-100, 0.01 mol/L Tris-HCl, 0.01 mol/L EDTA, pH = 8.0)<sup>[4]</sup>,混匀,100  $^{\circ}\text{C}$  煮沸 10 min 后,10 000 r/min 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 10 min,取上清于 -20  $^{\circ}\text{C}$  冻存备用。

#### 1.2.2.2 多重 PCR 检测 *S. aureus* 毒素基因

*sea*、*seb*、*sec*、*sed* 基因 4 对引物加入同一反应体系(反应总体积 50  $\mu\text{l}$ ),其中 10  $\times$  Buffer 5  $\mu\text{l}$  (含  $\text{MgCl}_2$ ),dNTP 4  $\mu\text{l}$ ,上下游引物分别为 1.5  $\mu\text{l}$  *sea*, 2  $\mu\text{l}$  *seb*, 1  $\mu\text{l}$  *sec*, 3  $\mu\text{l}$  *sed*, 4 U Taq 酶,模板 5  $\mu\text{l}$  双蒸水补足至 50  $\mu\text{l}$ ;反应条件为:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min, 58.5  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,循环 30 次;72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。*tsst-1*、*eta*、*etb*、*pvl* 基因 4 对引物加入同一反应体系,除引物浓度、退火温度外,其反应体系和反应条件同 *SEs* 基因,上下游引物均分别为 1.3  $\mu\text{l}$ , 55  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min。PCR 产物在 3% 的琼脂糖凝胶中电泳,100 V 电压 80 min 后,溴化乙锭溶液染色 20 min,清水冲洗后用凝胶成像系统观察结果。

## 2 结果

食品分离株中毒素基因检出率为 42.50% (17/40);食物中毒分离株中毒素基因检出率为 85.71% (18/21),经卡方检验,两者差异有统计学意义( $\chi^2 = 10.52, P < 0.01$ ),食物中毒分离株毒素基因的检出率明显高于食品分离株。

食品和食物中毒分离株中的毒素基因分布情况见表 2,两种分离株中毒素基因的分布均以肠毒素为主。但食品分离株中仍有 2 株检出 *pvl* 基因, 5 株检出 *eta* 基因,食物中毒分离株中 1 株同时检出 *eta*、*etb* 基因, 3 株检出 *tsst-1* 基因。

表 2 食品和食物中毒分离株中毒素基因的分布情况

Table 2 The distribution of toxin genes of *S. aureus* isolated from food and food poisoning

毒素基因	检出率/%	
	食品分离株	食物中毒分离株
<i>sea</i>	25.00 (10/40)	76.19 (16/21)
<i>seb</i>	7.50 (3/40)	9.52 (2/21)
<i>sec</i>	10.00 (4/40)	28.57 (6/21)
<i>sed</i>	5.00 (2/40)	4.76 (1/21)
<i>pvl</i>	5.00 (2/40)	0.00 (0/21)
<i>eta</i>	12.50 (5/40)	4.76 (1/21)
<i>etb</i>	0.00 (0/40)	4.76 (1/21)
<i>tsst-1</i>	0.00 (0/40)	14.29 (3/21)

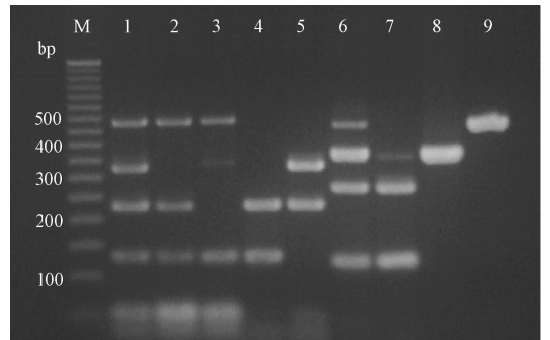
食品分离株和食物中毒分离株中得到的毒素基因型比较结果见表 3,两种分离株中毒素基因型除 *sea*、*sec* + *sed* 外,其他基因型并不相同。食品分离株中得到 8 种毒素基因型,主要流行的基因型为 *sea* 和 *sea* + *eta*。食物中毒分离株中得到 6 种毒素基因

型,主要流行的基因型为 *sea* 和 *sea* + *sec* + *tsst-1*。

表 3 食品和食物中毒分离株毒素基因型的分布

Table 3 The distribution of toxin phenotype of *S. aureus* isolated from food and food poisoning

毒素基因型	检出率/%	
	食品分离株	食物中毒分离株
<i>sea</i>	10.00 (4/40)	42.86 (9/21)
<i>sec</i> + <i>sed</i>	5.00 (2/40)	4.76 (1/21)
<i>seb</i>	5.00 (2/40)	0.00 (0/21)
<i>sec</i>	2.50 (1/40)	0.00 (0/21)
<i>eta</i>	5.00 (2/40)	0.00 (0/21)
<i>sea</i> + <i>pvl</i>	5.00 (2/40)	0.00 (0/21)
<i>sea</i> + <i>eta</i>	7.50 (3/40)	0.00 (0/21)
<i>sea</i> + <i>seb</i> + <i>sec</i>	2.50 (1/40)	0.00 (0/21)
<i>sea</i> + <i>seb</i>	0.00 (0/40)	9.52 (2/21)
<i>sea</i> + <i>sec</i>	0.00 (0/40)	9.52 (2/21)
<i>eta</i> + <i>etb</i>	0.00 (0/40)	4.76 (1/21)
<i>sea</i> + <i>sec</i> + <i>tsst-1</i>	0.00 (0/40)	14.29 (3/21)



注: M: 50 bp Marker; 1: *sea* + *seb* + *sec* + *sed*; 2: *sea* + *seb* + *sec*; 3: *sea* + *seb*; 4: *sea* + *sec*; 5: *sec* + *sed*; 6: *eta* + *etb* + *pvl* + *tsst-1*; 7: *eta* + *etb*; 8: *pvl*; 9: *tsst-1*

图 1 *S. aureus* 毒素基因多重 PCR 扩增结果电泳图

Figure 1 Agarose gel electrophoresis patterns showing multiplex PCR amplification products for the *S. aureus* genes

## 3 讨论

*S. aureus* 一直是医院感染监测和食源性疾病监测研究的重点细菌之一,从临床获取的标本与从污染食品和食物中毒获取的标本检测的侧重点并不相同,从临床获取的标本除检测肠毒素基因外,大多同时检测了 *pvl*、*tsst-1*、*eta*、*etb* 基因,而从污染食品和食物中毒中获取的标本多数只进行了 *SEs* 的检测,很少进行 *pvl*、*tsst-1*、*eta*、*etb* 基因的检测。国外曾有检测住院标本和食物污染标本毒素基因的研究<sup>[5]</sup>,却未能同时检测 *pvl* 基因,也没有对不同来源 *S. aureus* 毒素基因的流行情况进行比较。本研究对 2006—2011 年西安市食品污染物和食物中毒中分离的 *S. aureus* 进行了 *sea* ~ *sed*、*pvl*、*tsst-1*、*eta* ~ *etb* 等毒素基因的联合检测,并比较了两种分离株在基因分布及分型上的差异。

本研究表明,食物中毒分离株毒素基因的检出率明显高于食品分离株,两种分离株中毒素基因的分布均以肠毒素基因为主,*sea*的检出率最高(食品分离株和食物中毒分离株检出率分别为25%和76.19%),这与章乐怡等人<sup>[6]</sup>检测污染食品和食物中毒中*S. aureus*肠毒素基因(*sea*~*sed*)的结果较为接近,只有食物中毒分离株*sec*的检出率区别较大,原因可能是污染源和污染途径不同,从而导致*S. aureus*的流行情况也不尽相同。本研究进一步证实肠毒素是引起食物中毒的主要因子。

本研究的目的是之一了解*pvl*、*tsst-1*、*eta*、*etb*基因在污染食品和食物中毒分离株中的流行情况,结果表明,食品分离株中*eta*的检出率为12.5%,仅次于*sea*、*pvl*的检出率5%,食物中毒分离株中*tsst-1*的检出率高达14.29%,*eta*和*etb*的检出率均为4.76%。谭翰清等人<sup>[7]</sup>检测了从医院分离的*S. aureus*的毒力基因,其中*eta*基因携带率12%,*pvl*、*etb*、*tsst-1*基因携带率分别为8%、8%、4%,而携带这些毒素基因的菌株肠毒素基因均呈阴性。王凤玲等人<sup>[8]</sup>对84株临床分离株的*pvl*、*tsst-1*基因进行了检测,*pvl*基因阳性率为23.8%,未检出*tsst-1*基因。蔡朝阳等人<sup>[3]</sup>发现,116株临床分离株中,9株检出*pvl*基因(7.76%),*eta*、*etb*和*tsst-1*基因均未检出。不难看出,除了*pvl*基因,*tsst-1*、*eta*、*etb*基因在临床分离株中的检出率并不高,其检出率虽不高,但却有较重要的临床意义,较多研究<sup>[8-9]</sup>显示携带*pvl*、*tsst-1*基因的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)致病性很强,是临床治疗的难点。MRSA的标志性耐药基因为*mecA*,金黄色葡萄球菌食品和食物中毒分离株中携带*mecA*基因的比例有多大,值得做进一步的研究。本次研究中食品分离株中*eta*的检出率达到12.5%,食物中毒分离株中*tsst-1*的检出率达到14.29%,提示污染食品中分离的*S. aureus*可能有较高的潜在危险性,应引起研究人员的重视,加强肠毒素基因以外的毒素基因的检测。

分子分型方法在公共卫生事件调查中发挥了越来越重要的作用,通过对获取菌株的分子分型,不仅能分析食品污染物分离株的亲缘性关系,还可对食物中毒进行追根溯源。现代分子分型技术主要包括凝胶脉冲电泳技术(PFGE)、限制性内切酶技术、质粒DNA图谱分析、PCR及DNA测序技术等。本研究采用多重PCR法对*S. aureus*食品及食

物中毒分离株进行了毒素基因的分型研究,结果显示除共有*sea*、*sec*+*sed*外,其他基因型并不相同,这表明了*S. aureus*毒素基因型的多样性和复杂性。最常见的产*tsst-1*的*S. aureus*会同时携带*sea*和*tsst-1*两种基因。在Johnson等人<sup>[5]</sup>的研究中,发现了同时携带*sea*+*tsst-1*、*seb*+*tsst-1*、*sec*+*tsst-1*等基因型的菌株。本研究发现了3株携带*sea*+*sec*+*tsst-1*基因型的*S. aureus*,均来自于食物中毒样本。

与传统的免疫学方法相比,多重PCR方法的确是一种简单、高效、快速、敏感性和特异性都较高的方法,不失为细菌快速鉴定和分子分型的有力工具。一旦发生*S. aureus*引起的食品污染及食物中毒事件,采用多重PCR方法可在短时间内检测出它所携带的毒素基因,为公共卫生事件得到及时、有效控制提供科学依据。

## 参考文献

- [1] Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, et al. Involvement of Pantone-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia[J]. Clin Infect Dis, 1999, 29(5): 1128-1132.
- [2] 周正任. 医学微生物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 139.
- [3] 蔡朝阳, 马筱玲, 纪冰, 等. 金黄色葡萄球菌毒素基因的检测及临床应用[J]. 蚌埠医学院学报, 2008, 33(1): 9-11, 12.
- [4] 沈定霞, 罗燕萍, 徐雅萍, 等. 葡萄球菌对红霉素和克林霉素的诱导耐药性研究[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(4): 400-402.
- [5] Johnson W M, Tyler S D, Ewan E P, et al. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction[J]. J Clin Microbiol, 1991, 29(3): 426-430.
- [6] 章乐怡, 李毅, 马雪莲. 食物中毒及食品中金黄色葡萄球菌的肠毒素及基因的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(12): 2851-2853.
- [7] 谭翰清, 林凤, 谭海芳, 等. 医院分离金黄色葡萄球菌的毒力基因和耐药基因的研究[J]. 中国消毒学杂志, 2011, 28(6): 710-713, 716.
- [8] 王凤玲, 刘国华, 侯英荣. 多重PCR法检测金黄色葡萄球菌耐药基因及致病毒素基因[J]. 中国医药导报, 2010, 7(2): 70-71.
- [9] Lopez-Aguilar C, Perez-Roth E, Moreno A, et al. Association between the presence of the Pantone-Valentine leukocidin encoding gene and a lower rate of survival among hospitalized, pulmonary patients with Staphylococcal disease [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(1): 274-276.